

# Modulation of fetal hemoglobin in sickle cell anemia

Citation for published version (APA):

Saleh, A. W. (1998). *Modulation of fetal hemoglobin in sickle cell anemia*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19981030as>

**Document status and date:**

Published: 01/01/1998

**DOI:**

[10.26481/dis.19981030as](https://doi.org/10.26481/dis.19981030as)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Chapter X

---

**Summary and conclusive  
remarks**

---



## Summary and conclusive remarks

Sickle cell anemia, being the most common hereditary hemolytic anemia in the world, still presents a difficult medical problem. The cytotoxic agent hydroxyurea has recently shown to cause clinical amelioration in some sickle cell patients but it remains difficult to predict which patients will benefit from therapy with this drug. The beneficial effect of hydroxyurea has been mainly attributed to the induction of fetal hemoglobin (HbF). In this thesis it was investigated if the clinical effects of hydroxyurea in sickle cell (SS) patients were due to HbF induction only, or whether other mechanisms were also involved. Moreover, patients treated with hydroxyurea were studied in order to find some criteria that would adequately predict which patients would benefit from this treatment. Also, the effects on HbF production of isobutyramide, a non-cytotoxic alternative to hydroxyurea, were studied.

In Chapter I a discussion on the pathophysiology, diagnosis and treatment of sickle cell anemia is presented. Standing at the basis of the disease is a point mutation in the  $\beta$  globin gene which results in a substitution of the amino acid valine for glutamine at position 6 in the  $\beta$  chain of hemoglobin giving rise to the abnormal hemoglobin S. Hemoglobin S will polymerize in deoxygenated state and thus may form large strands of polymeres which cause the red blood cell to deform (typically a sickle shape) and interrupt red cell membrane function. Abnormal adherence, sludging and microvascular occlusion by sickle cells may cause ischemic damage which is clinically expressed as pain crises or specific organ vaso-occlusion. Hemolysis, another important clinical feature, results from increased breakdown of sickled cells. However, the clinical severity of disease of the SS patients reveals marked differences and may be influenced by many factors such as those that affect the HbF level and coexistent  $\alpha$ -thalassemia, factors determining the level of total hemoglobin and other hematological parameters, plasma components, vascular and environmental factors. The severity of sickle cell disease also correlates very well with the leucocyte count and the number of young deformable sickle cells which are known for their tendency to adhere to vascular endothelium. This adherence may be significantly modulated by the degree of imbalance in substances like nitric oxide, prostacyclins, platelet derived growth factor, endothelin, free oxygen radicals, proagulant factors, ligand proteins and cytokines that all interact with endothelium. The other factors that play a role in the clinical expression of disease are the extend of prior organ damage, changes in properties of the red blood cell itself and environmental factors. Treatment of the patient with sickle cell disease is still mainly supportive and symptomatic. Improved nutrition, better living standards, treatment and prevention of infections (vaccinations and antibiotic treatment) are responsible for the increase in life expectancy of SS patients during

the last decades. Rehydration, oxygen delivery, analgesia and in some situations antibiotics and exchange transfusions, help to relieve vaso-occlusive crises. Pharmacological HbF stimulation by hydroxyurea has resulted in improvement of symptoms in some patients. In the near future, butyrates and hematopoietic growth factors that also induce HbF synthesis could perhaps be useful either as combination treatment with hydroxyurea or as an alternative to hydroxyurea. Other chemical products that have been tried to ameliorate or prevent symptoms of the disease are drugs that have an antisickling effect, agents that increase oxygen affinity or promote capillary flow and anticoagulation. The benefit of most of these agents could not be confirmed in controlled trials and for some the data from ongoing trials are still unavailable. Experience with allogenic bone marrow transplantation for sickle cell disease has increased considerably, but transplantation still carries a mortality of 10%, as well as a risk of infertility. Moreover, there are still no data on chemotherapy-induced malignancies. Gene therapy, still the subject of intensive investigate research at the laboratory level, is considered to become the treatment of choice in the future. Meanwhile, with the growing knowledge of mechanisms of cellular adhesion, therapies that intervene at the level of cell adhesion to vascular endothelium should be explored.

Chapter II focuses on epidemiological and clinical aspects of SS disease in Curaçao using laboratory data, information on  $\beta^S$  haplotypes,  $\alpha$ -gene number and clinical features of a local group of 18 SS patients. Based on the findings in this group, the majority of the estimated 100 local SS patients are expected to carry haplotype 19/19 or the Benin type. The combination of HbS or HbC with  $\alpha$ -thalassemia carries an incidence of 4,1 %. No attempt has been made so far to detect compound heterozygotes for HbS and  $\beta$ -thalassemia. The painful crises and chronic hemolysis are the most common clinical presentations. Legulcers also have a high incidence and often reoccur repetitively in the same individual. The acute chest syndrome has a lower incidence but may be lifethreatening and is the most common cause of death in sickle cell patients in Curaçao. Before the sixties the average life expectancy of local SS patients was reported to be 20 years but this figure has undoubtedly improved in view of the advances in local health care over the past three decades. Environmental and psychosocial aspects as well as local management are briefly discussed.

Chapter III provides a review on the regulation and role of the HbF level as well as on the factors that influence the HbF levels. The clinical significance of HbF and the rationale of HbF induction in sickle cell anemia are discussed. The generally accepted fact that increased HbF levels have an inhibitory effect on sickling and ameliorate the clinical course of sickle cell disease has triggered research of pharmacological compounds that stimulate HbF synthesis. Agents such as

hydroxyurea, butyrate and its derivatives, erythropoietin and other hematopoietic growth factors have been shown to induce HbF production. The mechanism of action and clinical effects of these agents are reviewed.

The main objectives of the studies (chapter IV) described in this thesis were: A) to analyse the effects of hydroxyurea and the oral butyrate derivative, isobutyramide, on HbF production in sickle cell anemia. B) To determine which factors may predict the HbF as well as the clinical response of SS patients, and C) to study the effects of hydroxyurea on cytokines and soluble adhesion molecules, specifically involved in adherence of red cells and neutrophils to vascular endothelium, as well as hydroxyurea effects on endothelial and neutrophil activity and the procoagulant von Willebrand Factor.

Chapter V offers a short description on the methods that were used for detection and quantification of the various parameters that were studied in this thesis.

Chapter VI. The effects of isobutyramide on HbF synthesis were analysed as a treatment alternative to hydroxyurea, which is theoretically assumed to have a carcinogenic potential. Isobutyramide, an oral derivative of butyrate with a long half life, was administered to SS patients over a period of three months. The dosage was started at 50 mg/kg/day and increased in increments of 25 mg/kg up to 150 mg/kg/day. The maximum dose was maintained for three weeks. No significant change in HbF levels occurred but at the maximum dose of isobutyramide a relative increase of  $\alpha\gamma$  levels (one of the two globin chains of HbF) was observed. While in three patients the rate of hemolysis remained stable during treatment, one patient revealed an increase in lactate dehydrogenase. None of them experienced painful crises or other vaso-occlusive events. All patients developed temporary epigastric discomfort related to ingestion of isobutyramide. The trial was terminated when the epigastric discomfort turned to persistent intolerable dyspepsia in one patient. In view of these findings treatment with isobutyramide can not be recommended as a addition or alternative to hydroxyurea therapy.

During the first study with hydroxyurea in Curaçao (chapter VII) nine SS patients (eight with haplotype 19/19 and one with haplotype 19/3) have been treated during a 10 month period. Six of these patients were again treated with the drug during five months after an intermission of one year. Their individual hematological and clinical responses to this treatment are discussed. The hematological and biochemical values, the HbF level and the number of painful crises improve during therapy with hydroxyurea. However, although some patients experience clinical amelioration, the older patients as well as the patient carrying haplotype 19/3 (or

Benin/Senegal type) did not observe any changes in their condition. Also, one patient experienced a life-threatening liver sequestration crisis during treatment. It is concluded that the selection of patients who may benefit from hydroxyurea needs further evaluation. Furthermore, effects of hydroxyurea that may influence the clinical outcome other than by HbF induction, in particular effects on cellular adhesion, cytokines, vascular endothelium, neutrophil and platelet activity as well as procoagulant factors should be analysed.

Chapter VIII highlights the effects of hydroxyurea on soluble adhesion molecules (plasma representatives of specific membrane integrated adhesion molecules) and cytokine behaviour in seven SS patients. Baseline values of interleukin-3, interleukin-6, erythropoietin, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), stem cell factor (SCF) and soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sICAM-1, sE-Selectin and sP-Selectin) in SS patients are compared with normal adult controls and the cytokines and soluble adhesion molecules have been determined twice during a five month treatment with hydroxyurea. Results show no detectable effect on soluble adhesion molecules during hydroxyurea treatment, but the baseline levels of sVCAM-1 are enhanced in SS patients compared to normal controls. The sVCAM-1 levels during hydroxyurea therapy appear difficult to interpret due to fluctuation caused by clinical events. Baseline SCF levels in the SS patients are significantly reduced compared to normal adult controls. The explanation for this finding could be similar to the mechanism that has been postulated by others to clarify the relatively low erythropoietin in SS patients. The mechanism involves increased activity of other plasma factors which render circulating red progenitor cells much more sensitive to erythropoietin. Baseline levels of GM-CSF, interleukin-3 and interleukin-6 interleukin-3 in SS patients were equivalent to normal adult controls. Except for interleukin-3, the cytokines remained stable or revealed inconsistent changes during hydroxyurea therapy. Interleukin-3 showed an increase which paralleled the HbF increase in six patients during hydroxyurea therapy, suggesting that hydroxyurea may induce early erythroid progenitors capable of producing HbF production by a direct or indirect effect on interleukin-3 production.

Chapter IX discusses the effects of hydroxyurea on endothelial factors (such as IL-8, fibronectin and sVCAM-1), neutrophil soluble adhesion molecules (sL-Selectin, sIL-6 receptor- $\alpha$ ), and neutrophil activity (myeloperoxidase) as well as the procoagulant von Willebrand Factor.

These determinants of adhesion and vasoocclusion are compared with hematological and clinical data in a group of eight SS patients before and during five months of hydroxyurea treatment. Steady state sVCAM-1 levels are increased in all SS patients and a significant decrease is noted during hydroxyurea treatment implying

a decrease in the red cell- endothelial interaction. IL-8 levels are comparable to those in normal controls and remain unaffected by hydroxyurea therapy. Intercurrent infection and crises reveal significant increases in IL-8 which are accompanied by leucocytosis, but otherwise the IL-8 levels do not correlate with hematological data. Hydroxyurea does not affect levels of fibronectin or soluble neutrophil adhesion molecules. However, the levels of myeloperoxidase decrease significantly while leucocyte counts do not, suggesting a reduction in neutrophil activity which may help limit the extend of tissue destruction in the event of a vasoocclusive crisis.

### **Conclusive remarks**

The data presented in this thesis as well as other studies show that most sickle cell patients respond to hydroxyurea therapy with increase of HbF and a reduction in the rate of hemolysis. The consequent increase in hemoglobin diminishes transfusion requirements which may benefit patients that suffer of very low hemoglobin levels. Moreover, some patients experience a reduction in their frequency of painful crises. Still, the therapeutic effects of hydroxyurea in a sickle cell patient cannot be adequately predicted and the evaluation of significant clinical effect by laboratory means also has its shortcomings. The HbF increase in response to hydroxyurea differs widely between SS individuals. New information from a study by Steinberg (Semin Hematol 1997; 34: 8-14) reveals that increases in HbF are greatest in patients who have the highest baseline counts of reticulocytes and leucocytes, have one or more episodes of myelotoxicity and absence of the Bantu haplotype. Also, HbF levels during hydroxyurea therapy vary in time with only half of the patients showing a sustained HbF increase after 2 years. These SS individuals apparently have sufficient bone marrow reserve to continue to respond to myelotoxicity with proliferation of HbF producing erythroblasts. Probably reticulocyte and neutrophil counts are a measure of this bone marrow reserve. Patients older than 40 years should be expected not to gain much from hydroxyurea therapy since they have less frequent pain crises and are more prone to myelotoxicity because of diminished bone marrow reserve. Moreover, it is doubtful if patients with a less severe phenotypical expression of disease, like the Senegal or Saudi Arabian-Indian haplotype, will experience significant clinical benefit from hydroxyurea since they already carry high HbF levels. The identification of the SS individuals that qualify for hydroxyurea treatment is even more important due to the fact that hydroxyurea still poses a theoretical threat of carcinogenicity and teratogenicity. In addition to the influence of HbF on the clinical presentation of sickle cell anemia, the enhanced tendency of young deformable sickle cells to adhere to endothelium is also of critical importance to clinical course of the disease. The interpretation of clinical response to drug therapy should therefore include practical methods that determine the intensity of blood cell-endothelium



interaction. Circulating activated endothelial cells, enhanced steady state levels of sVCAM-1 in sickle cell patients compared to normal controls and increase of sVCAM-1 at the start of the vaso-occlusive crisis suggest the presence of a chronic activated endothelium state with increased sensitivity to certain crisis-precipitating factors as well as specific involvement of sVCAM-1 in red cell -endothelium interaction. The decrease of sVCAM-1, VLA-4/CD36 reticulocytes and myeloperoxidase levels following hydroxyurea therapy, are proof of beneficial actions of hydroxyurea other than its effects on HbF production. A combination of these parameters should be followed during future treatment of SS patients with hydroxyurea or other compounds in order to adequately predict and confirm clinical responses.

Regarding the follow up of SS patients during treatment with hydroxyurea, it is important to indicate that regular control should not only include careful monitoring of blood counts, but also of the packed cell volume. A High packed cell volume - in the case of the SS patient usually in excess of 0.30 l/l - results in a significant higher blood viscosity which may cause serious vaso-occlusive complications.

Oral derivatives of butyrate as well as certain hematopoietic growth factors could perhaps become alternatives to therapy with hydroxyurea particularly because they lack the myelotoxic effects and do not pose a risk of carcinogenicity. Isobutyramide, the drug tested in SS patients on Curaçao, did not qualify as effective therapy. There exists a narrow therapeutic margin which also holds true for butyrate as shown in other studies. Perhaps other oral butyrate analogues now under investigation may prove to possess better pharmacological qualities as well as being more potent HbF inducers. Combination of high dose erythropoietin with hydroxyurea and iron supplements has shown superior HbF increases but effects on clinical symptoms have not been adequately analysed and the financial costs involved with this treatment are extremely high. Due to these high costs it is doubted that this regimen will ever be of benefit to sickle cell patients in general. Furthermore, other hematopoietic growth factors should be evaluated with extreme caution since parenteral administration poses a serious risk of initiating a vasoocclusive crisis.

Finally, it should be stated that treatment with hydroxyurea or other agents does not replace invaluable supportive measures such as hygiene, proper nutrition, antibiotic treatment and regular counseling. However, in the next decade the HbF inducing agents and new therapies that are directed at specific mechanisms of adherence, may offer the possibility of clinical improvement to some sickle cell patients until - through gene manipulation - the addition of normal genes to the genome of the sickle cell patient becomes reality.

# Chapter XI

---

## Samenvatting

---



## Samenvatting

De behandeling van sikkelcelanemie, de meest voorkomende erfelijke hemolytische anemie in de wereld, vormt nog steeds een moeilijk medisch probleem. Hydroxyureum blijkt bij sommige patiënten verbetering van klinische symptomen te geven maar de klinische uitwerking is in het algemeen moeilijk te voorspellen. Het effect van deze behandeling is tot nu toe voornamelijk toegeschreven aan inductie van foetaal hemoglobine (HbF). Dit proefschrift heeft onderzocht of de klinische effecten van hydroxyureum alleen berusten op deze HbF inductie of dat er ook andere werkings-mechanismen van belang zijn. Bovendien is aan de hand van verschillende parameters gekeken of een eventueel gunstig klinisch effect van hydroxyureum therapie voorspeld kon worden. Tot slot zijn de effecten op de HbF synthese onderzocht van isobutyramide, een niet-cytotoxisch alternatief voor hydroxyureum.

In hoofdstuk I worden de pathofysiologie, diagnose en behandeling van sikkelcelanemie beschreven. De cruciale afwijking, te weten een puntmutatie in het  $\beta$  globine gen, is verantwoordelijk voor het ontstaan van het abnormale hemoglobine S, wat wordt gekarakteriseerd door een substitutie van het aminozuur valine in plaats van glutamine op positie no.6 in de  $\beta$  keten van het hemoglobine molecuul. In gedeoxygeneerde toestand polymeriseert het hemoglobine S en vormt dan multiple strengen van polymeren welke de erythrocyt -karakteristiek sikkelvormig-deformereren, waardoor de erythrocyt membraan functie verstoord wordt. Abnormale adhesie, vertraging van bloeddorstroming en microvasculaire occlusie door sikkcelcellen, kan ischemische beschadiging tot gevolg hebben, welke zich klinisch uit als pijn crises en/of ischemische beschadiging van specifieke organen. Een ander belangrijk gevolg is hemolyse, wat wordt veroorzaakt door de verhoogde afbraak van sikkcelcellen. De ernst van de klinische symptomatologie van HbSS patiënten verschilt per individu en wordt beïnvloed door verschillende factoren, zoals bijkomende  $\alpha$ -thalassemie en factoren, die een effect hebben op het HbF gehalte, het totale hemoglobine gehalte en andere hematologische parameters, alsmede verscheidene plasma componenten, vasculaire factoren en milieu invloeden. De ernst van sikkcelcelziekte blijkt niet alleen goed te correleren met het aantal leucocyten, maar ook met het aantal jonge, reversibel, deformeerbare sikkcelcellen, welke bekend zijn om hun verhoogde neiging tot adhesie aan de vaatwand. Adhesie van sikkcelcellen aan endotheel wordt op haar beurt beïnvloed door wanverhoudingen tussen stoffen zoals stikstofoxide, prostacyclines, endotheliale groeifactoren (o.a. PDGF), endotheline, vrije zuurstofradicalen, procoagulantia, ligand eiwitten, en cytokines welke allen de functie van het endotheel beïnvloeden. Tot slot spelen de eerder opgelopen orgaanschade en specifieke afwijkingen in membraan en cytoplasma van de erythrocyt ook een rol

bij de klinische expressie van sikkelcelanemie. Behandeling van de patiënt met sikkelcelanemie is nog steeds voornamelijk ondersteunend en symptomatisch van aard. Adequate voeding, verbeterde leefomstandigheden en vroege behandeling en preventie van infecties (vaccinaties en tijdige antibiotische behandeling) hebben de afgelopen decennia een significante verbetering van de overleving van HbSS patiënten met zich meegebracht. Rehydratie, zuurstof toediening, pijnstilling, en in specifieke situaties, antibiotica en wisseltransfusies, dragen bij tot de verlichting van sikkelcelcrisen. HbF stimulatie door hydroxyureum, veroorzaakt bij sommige patiënten een verbetering van de symptomatologie. Wellicht kunnen in de nabije toekomst nieuwe boterzuurderivaten en hematopoietische groeifactoren, welke ook HbF inductie veroorzaken, van nut zijn als alternatieve therapie of als combinatie behandeling met hydroxyureum. Andere chemische producten welke zijn uitgeprobeerd om de symptomatologie van de ziekte te verbeteren zijn stoffen die het sikkelen van cellen tegen zouden gaan, middelen die de zuurstofaffiniteit verhogen of de capillaire flow bevorderen en anticoagulantia. Bij de meerderheid van deze studies kon echter geen gunstige respons vastgesteld worden. Sommige trials zijn nog niet afgerond en resultaten zijn nog niet voorhanden. Ervaringen met allogene beenmerg transplantatie bij sikkelcel anemie zijn positief, maar de procedure heeft een mortaliteit van 10% en een risico op infertiliteit. Bovendien bestaan er nog onvoldoende gegevens over de kans op het ontstaan van een maligniteit als gevolg van de chemotherapie die bij de transplantatie gebruikt wordt. Gentherapie, momenteel nog steeds een onderwerp van intensieve research op laboratorium niveau, zal in de toekomst ongetwijfeld de behandeling van keuze worden. Tussentijds is er, gezien de groeiende kennis van de mechanismen van cellulaire adhesie, zeker plaats voor het ontwikkelen van behandelingen welke ingrijpen op het niveau van adhesie van bloedcellen aan vasculaire endotheel.

In hoofdstuk II wordt ingegaan op epidemiologische en klinische aspecten van sikkelcelziekte op Curaçao. Hierbij is gebruik gemaakt van laboratorium gegevens,  $\beta^S$  haplotypering, het aantal  $\alpha$ -genen en de klinische gegevens van 18 lokale HbSS patiënten. Op grond van deze gegevens kan worden aangenomen dat de meerderheid van de geschatte 100 lokale HbSS patiënten het haplotype 19/19 oftewel Benin type dragen. Voorts blijkt uit de literatuur dat lokaal de combinatie van HbS of HbC met  $\alpha$ -thalassemie een incidentie heeft van 4,1%. Er bestaat tot dusver geen informatie over het vóórkomen van combinaties van HbS met andere Hb varianten en  $\beta$ -thalassemie. De pijncrisen en chronische hemolyse vormen de meest voorkomende klinische presentatie. Recidiverende ulcera aan de benen hebben eveneens een relatief hoge incidentie. Het "chest syndroom" heeft een lage incidentie maar is levensbedreigend en vormt de belangrijkste doodsoorzaak van sikkelcelpatiënten op Curaçao. Veertig jaar geleden was de levensverwachting van de lokale sikkelcelpatiënten 20 jaar. Dit is sindsdien sterk verbeterd als gevolg van

de vooruitgang in de lokale gezondheidszorg. Invloeden van milieu, psychosociale aspecten en lokale aanpak van sikkelanemie worden kort besproken.

Hoofdstuk III biedt een overzicht van de regulatie van het HbF gehalte en de factoren welke het HbF gehalte beïnvloeden. De klinische betekenis van HbF en het nut van HbF inductie bij sikkelcelpatiënten worden besproken. Het feit dat een hoog HbF gehalte een remmend effect heeft op het sikkelen en vaak samengaat met een klinisch milder beloop van sikkelcel anemie heeft aanleiding gegeven tot onderzoek naar farmacologische stoffen, die de HbF productie stimuleren. Verscheidene stoffen zoals hydroxyureum, boterzuur, boterzuurderivaten, erythropoietine en andere hematopoietische groeifactoren zijn in staat om HbF productie te stimuleren. Het werkingsmechanisme en de klinische uitwerking van deze stoffen worden besproken.

De studies in dit proefschrift (hoofdstuk IV) hebben tot doel gehad: A) het bestuderen van het effect van hydroxyureum evenals het orale boterzuur derivaat, isobutyramide, op de productie van foetaal hemoglobine (HbF) bij patiënten met homozygote sikkelcel- anemie (HbSS). B) het bepalen van specifieke factoren bij homozygote sikkelcel-patiënten welke zowel de respons van het HbF-gehalte als de klinische symptomen op hydroxyureum therapie kunnen voorspellen, en C) het bestuderen van effecten van hydroxyureum op cytokines and oplosbare adhesie moleculen, welke specifiek betrokken zijn bij de adhesie van erythrocyten en neutrofiele granulocyten aan de vaatwand, evenals de invloed van hydroxyureum op de activiteit van endotheel, de activiteit van neutrofiele granulocyten en de procoagulant von Willebrand Factor.

In hoofdstuk V worden de methoden, welke gebruikt zijn bij de bepaling van diverse parameters in de studies, toegelicht.

In hoofdstuk VI wordt het effect van isobutyramide op de HbF synthese bestudeerd. Isobutyramide, een oraal derivaat van boterzuur met een lange halfwaardetijd, wordt verondersteld, in tegenstelling tot hydroxyureum, geen carcinogene werking te hebben. Het werd toegediend aan vier HbSS patiënten over een periode van drie maanden. De start dosis bedroeg 50 mg/kg/dag en werd geleidelijk opgehoogd met 25 mg/kg/dag tot een maximum van 150 mg/kg/dag. De maximum dosis werd gedurende drie weken gehandhaafd. Er werden geen significante veranderingen in het HbF gehalte vastgesteld, maar bij de maximum dosis van isobutyramide ontstond een relatieve toename van  $^6\gamma$  (één van de twee soorten eiwitketens van het foetale hemoglobine). Drie patiënten toonden geen verandering van hemolyse parameters. Bij één patiënt echter, werd een toename van het lactaat dehydrogenase waargenomen. Geen enkele patiënt ontwikkelde een

pijncrise of een andere orgaancrise tijdens therapie. Alle vier patiënten ontwikkelden een branderig gevoel in epigastrio aansluitend aan de ingestie van isobutyramide. De trial werd gestaakt als gevolg van het ontwikkelen van onverdragelijke dyspepsie bij één van de patiënten. Gezien deze bevindingen werd geconcludeerd dat isobutyramide niet beschouwd kan worden als een waardevolle aanvulling op, of alternatief voor, de hydroxyureum behandeling.

In hoofdstuk VII wordt de eerste studie met hydroxyureum in Curaçao besproken. Er zijn negen HbSS patiënten, acht met haplotype 19/19 en één met haplotype 19/3, behandeld gedurende een periode van 10 maanden. Na een pauze van één jaar, zijn zes van deze patiënten opnieuw behandeld met hydroxyureum gedurende vijf maanden. Van elk van de patiënten wordt de hematologische en klinische respons besproken. Gedurende hydroxyureumtherapie verbeterden de hematologische en biochemische parameters, het HbF-gehalte en het aantal pijncrisen. Desondanks ondervonden de oudere patiënten, alsmede de patiënt met haplotype 19/3, geen verandering in hun conditie. Bovendien ontwikkelde één van de patiënten een levensbedreigende leversequestratie-crise gedurende de behandeling. Er wordt geconcludeerd dat er meer criteria gedefinieerd dienen te worden teneinde te kunnen komen tot selectie van die patiënten, die klinisch goed reageren op hydroxyureum. Bovendien is het zinvol, naast de effecten op de HbF synthese, ook de effecten van hydroxyureum op cellulaire adhesie, cytokines, endotheel, activiteit van granulocyten en thrombocyten alsmede de uitwerking op procoagulantia te onderzoeken.

In hoofdstuk VIII wordt ingegaan op de invloeden van hydroxyureum op oplosbare adhesiemoleculen (plasmavertegenwoordigers van specifieke membraangeïntegreerde adhesiemoleculen) en gedrag van cytokines tijdens behandeling met hydroxyureum van zeven HbSS patiënten. Uitgangswaarden van interleukine-3, interleukine-6, erythropoietine, granulocyt-macrofaag kolonie stimulerende factor (GM-CSF), stamcellfactor (SCF) en oplosbare adhesiemoleculen (sVCAM-1, sICAM-1, sE-Selectine en sP-Selectine) van HbSS patiënten werden vergeleken met normale volwassen controle personen. Tijdens de vijf maanden durende behandeling zijn cytokines en oplosbare adhesiemoleculen twee maal bepaald. De resultaten tonen geen significant effect van hydroxyureum op oplosbare adhesiemoleculen. De uitgangswaarden van sVCAM-1 zijn significant verhoogd bij alle patiënten vergeleken met normale controles. De sVCAM spiegels tijdens behandeling blijken moeilijk te interpreteren. Dit wordt verklaard door de mate van fluctuatie van sVCAM-1 als gevolg van klinische effecten c.q. complicaties. De uitgangswaarden van SCF zijn significant verlaagd in vergelijking met normale controles. Mogelijk dat deze bevinding verklaard kan worden door hetzelfde mechanisme, dat verantwoordelijk is voor de relatief lage erythropoietine spiegels

bij HbSS patiënten. Dit mechanisme behelst een toegenomen activiteit van diverse plasmafactoren welke de circulerende voorlopers van de erythrocyt veel gevoeliger maken voor de effecten van erythropoietine. Uitgangswaarden van GM-CSF, interleukine-3 en interleukine-6 van HbSS patiënten waren vergelijkbaar met normale volwassen controle personen. Met uitzondering van interleukine-3 bleven de cytokines stabiel gedurende behandeling. Bij zes van de zeven HbSS patiënten werd een stijging van interleukine-3 parallel aan de HbF toename waargenomen tijdens hydroxyureumtherapie. Hieruit zou geconcludeerd kunnen worden dat hydroxyureum, via een direct dan wel indirect effect op de interleukine-3 productie, vroege voorlopers van de erythroïde reeks induceert, met name die welke in staat zijn tot HbF-productie.

Tot slot worden in hoofdstuk IX de effecten van hydroxyureum op endotheliale factoren (zoals interleukin-8, fibronectine en sVCAM-1) bestudeerd, evenals de effecten op oplosbare adhesiemoleculen van de neutrofiele granulocyt (sL-Selectine, sII-6 receptor- $\alpha$ ), de activiteit van de neutrofiele granulocyt (myeloperoxidase) en de procoagulant von Willebrand Factor. Deze determinanten van adhesie en vaso-occlusie zijn bij acht HbSS patiënten bekeken en tegelijkertijd bestudeerd in relatie tot de hematologische en klinische gegevens vóór en gedurende vijf maanden van therapie met hydroxyureum. Uitgangswaarden van sVCAM-1 waren wederom verhoogd in HbSS patiënten. Tijdens hydroxyureum therapie werd ditmaal een significante daling van sVCAM-1 waargenomen hetgeen een afname impliceert in de erythrocyt-endothelium interactie. Interleukine-8 waarden waren vergelijkbaar met die van normale controles en veranderden niet tijdens hydroxyureumtherapie. Echter, intercurrente infectie en crises werden gekarakteriseerd door een duidelijke stijging van het interleukine-8 gehalte. Behoudens leucocytose tijdens infectie of crise werd er geen duidelijke correlatie tussen IL-8 en hematologische parameters waargenomen. Hydroxyureum bleek geen invloed uit te oefenen op fibronectine of oplosbare adhesie moleculen van de neutrofiele granulocyt. Daarentegen namen de myeloperoxidase-spiegels significant af, terwijl het aantal leucocyten vrijwel onveranderd bleef. De afname van de activiteit van neutrofiele granulocyten welke hierdoor gesuggereerd wordt, kan in geval van een sikkelcel-vaso-occlusie de uitbreiding van weefseldestructie helpen beperken.

## Conclusies

De resultaten welke gepresenteerd worden in dit proefschrift evenals in andere studies tonen dat de meeste sikkelcelpatiënten reageren op hydroxyureum met een stijging van HbF en een afname van hemolyse. De daaruit voorkomende stijging van het hemoglobine gehalte veroorzaakt een reductie in de transfusie behoefte hetgeen een klinische verbetering betekent voor patiënten die een erg laag



hemoglobine gehalte hebben. Een aantal patiënten ervaart een vermindering van hun pijncrisen. Echter, de therapeutische effecten van hydroxyureum bij de sikkelcelpatiënt kunnen nog niet goed voorspeld worden en de evaluatie van een significant klinisch effect door middel van laboratoriumonderzoeken kent ook tekortkomingen. De toename van HbF tijdens hydroxyureum therapie laat belangrijke interindividuele verschillen zien. Volgens een zeer recente studie van Steinberg (Semin Hematol 1997; 34: 8-14) wordt de sterkste stijging van HbF waargenomen bij patiënten met de hoogste aantallen reticulocyten en leucocyten, bij patiënten die één of meer episodën hebben van myelotoxiciteit en bij afwezigheid van het Bantu haplotype. Ook blijkt het HbF gehalte te variëren in de tijd en slaagt slechts de helft van de patiënten erin om het niveau van HbF toename te handhaven gedurende een twee jaar durende therapie. Deze HbSS patiënten worden gekenmerkt door een goede beenmergreserve welke steeds weer instaat is om te reageren op myelotoxiciteit met proliferatie van HbF-producerende erythroblasten. Waarschijnlijk zijn reticulocyt en leucocyt aantallen een maat voor deze beenmergreserve. Patiënten boven de 40 jaar zullen minder baat hebben bij de hydroxyureumtherapie aangezien zij over het algemeen minder pijncrisen hebben en gevoeliger zijn voor myelotoxiciteit als gevolg van geringere beenmergreserve. Bovendien kan betwijfeld worden of patiënten met een minder ernstige klinische expressie van sikkelcelanemie, zoals patiënten met het Senegal of Saudi Arabische-Indiase haplotype, een significante verbetering zullen ervaren bij hydroxyureumtherapie, gelet op het feit dat zij in het algemeen reeds een verhoogd HbF gehalte hebben. Ook het feit dat hydroxyureum therapie nog steeds een theoretisch risico op carcinogenese en teratogenese draagt, maakt het des te belangrijker HbSS patiënten, welke baat zullen hebben bij hydroxyureum therapie, correct te identificeren. Naast de uitwerking van HbF inductie op de klinische symptomen, speelt ook de neiging tot adhesie van jonge sikkelcellen aan de vaatwand een kritieke rol. Met betrekking tot de interpretatie van de klinische respons op farmacologische behandeling is het derhalve noodzakelijk dat deze verbeterd en vereenvoudigd kan worden door middel van laboratoriumbepalingen die de intensiteit van bloedcel-endotheel interactie weergeven. Circulerende geactiveerde endotheliale cellen, toegenomen uitgangswaarden van sVCAM-1 in sikkelcelpatiënten ten op zichte van normale controle personen en toename van sVCAM-1 bij aanvang van de sikkelcelcrise pleiten voor een chronisch geactiveerd endotheel met verhoogde gevoeligheid voor crisis-uitlokkende factoren evenals een specifieke rol van sVCAM-1 bij de erythrocyt-endotheel interactie. Afname van sVCAM-1, VLA-4/CD36 reticulocyten en myeloperoxidase tijdens hydroxyureumbehandeling is een bewijs van een therapeutische werking van hydroxyureum naast het effect op de HbF productie. Een combinatie van deze parameters zou, bij behandeling van HbSS patiënten met hydroxyureum of andere producten, bepaald dienen te worden teneinde een adequate klinische respons te

kunnen voorspellen.

Ten aanzien van de follow up van HbSS patiënten tijdens behandeling met hydroxyureum moet opgemerkt worden dat men het bloedbeeld niet alleen dient te controleren op tekenen van myelotoxiciteit, maar ook op belangrijke veranderingen in de hematocriet. Een verhoogde hematocriet, in geval van de HbSS patiënt meestal boven 0.30 l/l, veroorzaakt significante stijging van de bloedviscositeit en kan zodoende een ernstige sikkcelcrise luxeren.

Met betrekking tot de behandeling van patiënten met sikkcelanemie, zouden orale derivaten van boterzuur evenals bepaalde hematopoietische groeifactoren een alternatief op hydroxyureum therapie kunnen vormen, met name daar zij geen myelotoxische en mutagene werking hebben. Isobutyramide, het orale boterzuur derivaat waarmee enkele HbSS patiënten in Curaçao in trialverband werden behandeld, bleek geen effectieve therapie te zijn. Er bestond een nauwe therapeutische breedte zoals reeds bij eerdere studies met intraveneuze behandeling met boterzuur was vastgesteld. Wellicht dat andere orale boterzuur derivaten, welke momenteel onderzocht worden, over betere farmacologische kwaliteiten beschikken en een sterker effect uitoefenen op de HbF- productie. Van combinatie van hoge dosis erythropoietine met hydroxyureum en ijzer suppletie is aangetoond dat dit nog sterkere HbF toename veroorzaakt, maar de klinische effecten werden tot dusver niet goed bestudeerd. Daarbij zij vermeld dat de financiële kosten, gemoeid met deze vorm van behandeling, extreem hoog zijn. In verband met deze hoge kosten is het twijfelachtig of deze behandeling ooit op grote schaal bij sikkcelpatiënten zal worden toegepast. Bovendien dient het inschakelen van andere groeifactoren bij de behandeling van sikkcelpatiënten met uiterste voorzichtigheid te geschieden, aangezien parenterale toediening van deze producten als potentieel risico heeft het luxeren van vaso-occlusie.

Tot slot mag gesteld worden dat behandeling met hydroxyureum of andere producten geen vervanging is voor belangrijke ondersteunende maatregelen zoals hygiëne, goede voeding, antibiotische behandeling en educatie. Desalniettemin, kunnen in de komende tien jaar producten, die HbF induceren en producten die op specifieke plaatsen aangrijpen in het mechanisme van adhesie, klinische vooruitgang bieden aan sommige sikkcelpatiënten. Dit alles uiteraard in afwachting van het moment dat genetische manipulatie de incorporatie van normale  $\beta$  genen in het chromosoom tot werkelijkheid maakt.